

**Zárójelentés a “Tumorellenes anyagok hatásának összefüggése a nitrogénmonoxid-szintézissel, mint a szervezet egyik lehetséges antitumor védekezési reakciójával” c. (T 043075 sz.) témáról**

A kutatómunkának eredetileg két fő célja volt. Egyrészt apatogén vírusoknak az NO-szintézis befolyásolása révén kifejtett tumorellenes hatásait, másrészt tumorellenes tulajdonságú peptidek és apoláros receptor tirozinkináz (RTK) -gátlók esetleges NO-szintézist befolyásoló hatásait vizsgáltuk. A fenti témákon belül az alábbi fontosabb kísérlet-sorozatokot terveztük és végeztük el:

1. A tapasztalatok alapján daganatellenes hatást mutató Newcastle Disease Virus (NDV) vakcina hatását vizsgáltuk arra vonatkozóan, hogy patkányok in vivo kezelése után az eltávolított makrofágokban hogyan változik az NO termelése és az indukálható NO-szintáz (NOS II), valamint a vele reciprok kölcsönhatásban expresszálandó argináz aktivitása és mennyisége.
2. Megvizsgáltuk, hogy a vakcina hatása mennyiben azonos, illetve eltérő más, az NO-szintézist in vivo indukáló kezeléseivel.
3. Mértük, hogy a vakcina illetve az összehasonlító kezelések során hogyan változik a makrofágok citokin-termelése és fagocitózisa, mint két, a makrofágokat jellemző immunológiai funkció.
4. Megvizsgáltuk, hogy egy szomatosztatin-analóg, tumorellenes hatást mutató peptid, valamint több, eltérő kémiai szerkezetű RTK-gátló vegyületnek van-e hatása a makrofágok NO-termelésére, valamint egyéb immunológiai funkcióira (fagocitózis).
5. A makrofágok NO-termelésének funkcionális tesztelése céljából összehasonlító kísérleteket végeztünk különböző transzformált sejtvonalak NO-érzékenységeire vonatkozóan, azok túlélésének, proliferációjának és apoptózisának vizsgálata révén.
6. Vizsgálatokat végeztünk a makrofágok arginin-anyagcseréjének egyéb sajátosságaira vonatkozóan is: így az arginin-felvétel, az argináz allosztérikus gátlása és az argináz illetve NO-szintáz gátlószerek más fehérjékre kifejtett hatása vonatkozásában.

7. A vizsgálatok során kooperációban neurális nitrogén-monoxid szintáz (NOS I) aktivitást mértünk a hipotalamikus keringés NO-blokádhoz való adaptációjával kapcsolatos programban (az eredeti programban nem szerepelt).

*A kísérletek során a fenti kérdésekkel kapcsolatban az alábbi eredményeket értük el:*

1. Előzetes kísérletekben meghatároztuk, hogy milyen NDV-vakcinadózissal célszerű a patkányokat kezelni: a  $6 \cdot 10^4$ - $6 \cdot 10^8$  vírus/állat tartomány bizonyult megfelelőnek. Kontrollként azonos térfogatban beadott fiziológiás sóoldattal kezelt, valamint teljesen kezeletlen állatokat is használtunk, 14 napos adagolást alkalmaztunk. A kísérletek során megállapítható volt, hogy: a.) az NDV vakcina hatására dóziszfüggően jelentős mértékben megnőtt az izolálható peritoneális makrofágok száma, amely  $6 \cdot 10^6$  vírus bevitelkor volt maximális (a kezeletlen állatokhoz képest 6-szoros); b.) az izolált makrofágok sejt kultúráiban jelentősen és dóziszfüggően emelkedett az NO-végtermék nitrit termelése (kb. 4-szeresére); c.) optimális ( $6 \cdot 10^4$ ) dózis mellett nőtt a NOS II aktivitása (kb. 1.5-szörösére), magasabb vakcina-dózisok mellett nem volt emelkedés;; d.) dóziszfüggően emelkedett a NOS II expressziója (max. kb. 4.5-szörösére). A NOS II aktivitás és az expresszió, illetve nitrit-termelés növekedésének jellege közötti eltérés azzal magyarázható, hogy a 24 órás kultúrákban (ezekben mértük a NOS II aktivitást) a makrofágok egy része már elpusztult a magas NO-termelés következtében, ezért itt nem a legmagasabb dózisoknál mérhető a legnagyobb aktivitás-emelkedés. Ezt exogén NO-donorok hozzáadásával igazoltuk is (ref.2,3.).
2. A fent említett kezelések hatására sem az arginin-transzport, sem az argináz aktivitása és expressziója nem változott szignifikánsan (ref.3.).
3. Megállapítottuk, hogy a COS 7 majom vesedaganat-eredetű sejtvonal NO-érzékeny és úgy NO-donorok, mint makrofágok hatására a COS 7 sejtek pusztulása megfigyelhető (élősejtszám-vizsgálatban 75 % illetve 95% sejtpusztulás), és timidin-inkorporációjuk is csökken (80 % csökkenés, ref.2,3.).
4. Összehasonlító kísérletben megmértük a fenti hatásokat úgy is, hogy az NDV-vakcina beadása nem intraperitoneálisan, hanem farokvénába történt. Ebben az esetben a fenti hatások lényegesen gyengébben jelentkeztek, nem bizonyultak szignifikánsnak. Ez több lehetséges okkal magyarázható: a vérbe beadott vírusok hatására képződő mediátorok nem, vagy nem megfelelő mennyiségben jutottak el a

peritoneumba; a vírusok csak közvetlen kontaktus esetén idézik elő a makrofágok indukcióját; a farokvénába történő beadás technikai hibái miatt a beadott dózis jelentős része nem a vérbe, hanem a környező szövetekbe került és nem jutott el az állat szervezetének más szöveteibe. Az értékek bizonytalansága miatt ezen eredmények közlésére nem került sor.

5. Összehasonlító kísérletben megmértük, hogy más i.p. kezelések hogyan hatnak a peritoneális makrofágok arginin-anyagcseréjének két útjára. Három immunológiailag aspecifikus (tioglikolát, kazein, karragenát) és egy immunológiailag specifikus (BCG) kezelést alkalmaztunk (Ref. 4.) peritoneális injekcióval. Egerekben és patkányokban eltérő eredményeket kaptunk. Egerekben a NOS II expresszióját a kazeines (több, mint 20-szorosára), valamint a BCG és NDV-kezelések (15-18-szorosára) emelték, míg patkányokban a kazein és NDV igen erős növelő hatásán (6-szoros, illetve 8-szoros, az egérhez képest lényegesen magasabb rezidens alapértékről indulva) kívül a többi kezelés is jelentősen fokozta az expressziót. Az argináz expresszióját egereknél a karragenát kivételével valamennyi kezelés jelentősen növelte (3-5-szörösére), patkányokban azonban egyik kezelésnek sem volt szignifikáns fokozó hatása. Valamennyi kezelés hatására növekedett az izolált peritoneális makrofágok száma is (2-3-szorosra), egerekben a kazein és NDV, patkányokban a kazein és BCG hatása volt a legerősebb. Összefoglalva, a peritoneális makrofágok mind immunológiailag aspecifikus, mind specifikus ágensek hatására kiváltott gyulladásos folyamatok során mobilizálódnak és aktiválódnak, növelik NO-szintézisüket, amely patkányokban jelentősebb mértékű, egerekben viszont emellett nő az argináz expressziója és így az alternatív reakcióút is működik.

6. A British Journal of Pharmacology felkérésére egy cikk bírálatát követően egy G-protein-kapcsolt receptorra specifikus NOS és argináz gátlókkal kapcsolatos vizsgálat elméleti értékelését végeztük el a kötésre specifikus csoportok azonosítására vonatkozóan. Ennek eredménye, hogy a NOS és argináz esetéhez hasonlóan az  $\alpha$ -szénatomon levő csoportok szterikus helyzete, valamint az aminosav-oldalláncon található csoportok bázikus jellege a meghatározó, ezért feltételezhető a kötőhelyek homológiája, annak ellenére, hogy a teljes szekvencia homológiája alacsony (12-14 %). Mivel azonban ez a homológia az argináz-NOS viszonylatban sem magasabb, rövidebb, a kötésben résztvevő szakaszokon lehetséges hasonló primer, vagy térbeli szerkezet létrejötte (ref. 5).

7. A korábban antitumor-hatást mutató vegyületek közül a Kéri Gy. és munkacsoportja által előállított TT-232 szomatosztatin-analóg, valamint az ugyancsak általuk előállított néhány, kémiaiilag eltérő szerkezetű apoláros RTK-gátló vegyület hatását tanulmányoztuk rezidens makrofágokon in vitro kísérletekben. A TT-232 ugyan mutatott egyes kísérletekben NOS-indukáló hatást, de ezt nem tudtuk megbízhatóan reprodukálni. A tirozinkináz-gátlók esetében viszont nem aktiváló hatást észleltünk, hanem inkább csökkent a makrofágok NO-szintézise (ref. 6,7).

A fenti ok miatt az eredeti tervet kissé módosítva azt kezdtük tanulmányozni, hogy van-e ezeknek a vegyületeknek az indukált makrofágok immunológiai funkcióját károsító hatásuk és ez mennyire általános. A NOS II expresszióján kívül a makrofágok fagocitózist, mint fontos immunológiai funkciót vizsgáltuk. Ezekben a kísérletekben néhány NDV-kezelés mellett főleg in vivo kazeines kezeléssel indukált makrofágokat használtunk.

Megállapítható volt, hogy a hat vegyület közül egy jelentősen károsította a makrofágok NOS II termelő képességét és fagocitáló kapacitását egyaránt, míg három további vegyület részlegesen, vagy az egyik, vagy a másik vizsgált funkciót rontotta. A legerősebben gátló vegyület a 6-(2,6-diklór-fenil)-2-(4-hidroxi-fenilamino)-8-metil-8H-pirido[2,3-d] pyrimidin-7-on (mind a fagocitózist, mind az NO-termelésben kb. 60 %-os csökkenést okozott), míg a másik három a 5-klór-3-(4-hidroxi-3,5-diizopropil-benzilidén)-1,3-dihidro-indol-2-on, a 7-dimetoxi-kinazolin-4-il)-fenetil-amin és a 7-amino-2-(4-hidroxi-3,5-dimetil-benzilidén)-5,6-dimetoxi-indán-1-on volt (30-40 %-os csökkenéseket okozott). Ugyanekkor volt a vizsgált anyagok között olyan is, amely egyáltalán nem hatott a makrofágokra (pl. 2-ciano-3-(3,5-di-tert-butil-4-hidroxi-fenil)-tioakril-amid), akárcsak egy hetedik, belső kontrollként használt olyan vegyület, amely az orotsav dekarboxilációját gátolva, tehát nem tirozinkináz-gátlóként fejt ki antitumor hatást. A mechanizmus további vizsgálata során kiderült, hogy a fagocitózist blokkoló vegyületek a makrofágokban korai apoptózist is indukálnak, amint azt a mitokondriumok  $\psi$ -potenciáljának megszüntetését jelző fluoreszcens teszt igazolta (ref. 7.). A vizsgálat gyakorlati jelentőségére még kitérünk, itt röviden csak azt a konklúziót említjük meg, hogy egyes RTK-gátlók a tumoros célsejtek elpusztításán kívül az immunrendszer effektor sejtjeit is károsíthatják.

8. Sejtvonalak NO-érzékenységének összehasonlítása. Bár a COS 7 megfelelő célsejtnak bizonyult az indukált makrofágok és az általuk termelt NO tumorelles hatásának monitorozására, céljaink között szerepelt az is, hogy különböző sejtvonalak NO-érzékenységét összehasonlítsuk. A COS 7 sejtek mellett három másik sejtvonal, a humán epidermális A 431, a humán colon carcinoma SW 480 és a hepatikus eredetű HepG2 sejtek viselkedését vizsgáltuk, mindegyik esetben az élő sejtszámot, a timidin-inkorporációt és az apoptózist teszteltük. Az élősejt-vizsgálat (MTT) alapján valamennyi sejtvonal érzékenynek bizonyult NO-donorokra, amelyek közül az NO-t lassan felszabadító nátrium-nitroprusszidot (NaNP) választottuk. Az SW 480 esetén magasabb  $IC_{50}$  értéket kaptunk NaNP-re, a többi esetében mérhető 1.5 mM helyett itt annak kétszerese, 3 mM okozott 50 % sejtpusztulást. A timidin-inkorporáció csökkenése viszont magasabb, 5 mM körüli NaNP-koncentráció esetén volt csak egyértelmű, ami 30-60  $\mu$ M közötti nitrit (NO)-felszabadulásnak felelt meg. Érdekes módon alacsony, 1 mM-os NaNP koncentráció esetén még nőtt is a timidin beépülés, ennek okát egyelőre nem tudtuk megállapítani. Apoptózist csak alacsonyabb NaNP-koncentrációknál tudtunk kimutatni, mert a jelentős sejtkárosodással járó magasabb (2 mM feletti) NaNP-koncentrációk mellett az elpusztult sejtek leváltak a fedőlemezekről és így a mitokondriális potenciál károsodását nem lehetett mikroszkóposan detektálni. Végeztünk kezelést közvetlenül peroxinitrittel is. Ebben az esetben erős sejtpusztulás jelentkezett, drasztikusan csökkent a timidin-inkorporáció is (gyakorlatilag teljes 95-100 %-os volt a gátlás) és apoptózist is detektáltunk. Megpróbáltuk kimutatni az esetleges nitrotirozint tartalmazó fehérjé(ke)t is Western blottal, de ez eddig nem vezetett eredményre. NOS II-t egyik sejtvonalban sem találtunk, viszont a HepG2 sejtekben mérhető argináz-aktivitást mutattunk ki, összhangban azok máj-eredetével. A kísérletek eredményeiből a közeljövőben tudunk benyújtható közleményt összeállítani.

9. Az argináz enzim allosztérikus gátlásának vizsgálata. Az irodalomból és saját kísérleteinkből is ismert volt számos argináz-gátló vegyület. Ezeknek jelentősége abban van, hogy az NO-termeléssel reciprok szabályozás alatt álló argináz-reakcióút gátlása révén fokozhatják az NO képződését. Ezek az enzim aktív centrumához kapcsolódva hatnak, gyakran az argináz aktivitásához szükséges  $Mn^{2+}$ -ionokhoz kötődnek. Máj-eredetű és makrofág argináz vizsgálata során azt tapasztaltuk, hogy a triptofán és több más, indolgyűrűt tartalmazó aminosav-származék (triptamin,

szerotonin, indolpropionsav, indoltejsav, triptofol) is képes gátolni az argináz aktivitását és ez a gátlás alloszterikus jellegű. A legalacsonyabb  $IC_{50}$  értéket indolpropionsavra (2.8 mM) és triptaminra (3.2 mM) mértük. A változás szerkezeti okának vizsgálata során a cirkuláris dikroizmus mérések alapján azt találtuk, hogy az argináz másodlagos szerkezetében következnek be kisebb változások (az  $\alpha$ -helix tartalom 40-42 %-ról 55-60 %-ra nőtt, a  $\beta$ -lemezek aránya 20 %-ról 10 % alá csökkent, a random coil változatlan maradt), míg a hidrofób aminosavak elhelyezkedésében, az aktív centrum mangán-ionjainak esetleges lekötésében, vagy a negyedleges szerkezetben nem találtunk érdemleges változást (ref. 8.).

10. Vizsgálatainkban foglalkoztunk az arginin-transzporter szubsztrát- és gátlószerkötésében szerepet játszó szerkezeti tényezők azonosításával is. Bár az arginin-transzporterek kinetikai szempontból, sőt izoformáik tekintetében is ismertek az irodalomból, a kötésben résztvevő csoportok szisztematikus összehasonlító vizsgálatát eddig még nem végezték el. Ehhez számos aminosav és aminosavszármazék transzportgátló hatását mértük meg.

A kísérletekben egér peritoneális makrofágokat használtunk, mert ezekben mindkét arginin-felhasználó enzim megtalálható. Az arginin felvételét rövid (5 perces) tesztekben mértük, kb. 85 vegyület hatását vizsgáltuk. Néhány vegyület előzetes vizsgálatával megállapítottuk, hogy a gátló vegyületek hatása vegyes jellegű, de a kompetitív karakter meghatározó. Biológiai aktivitásként az adott vegyületnek a felvétel 50 %-os gátláshoz szükséges koncentrációját ( $IC_{50}$  érték) adtuk meg. A leghatékonyabb gátlást arginin-analógok, illetve  $N^G$ -szubsztituált arginin-vegyületek mutatták:  $N^G$ -metilarginin, L-homoarginin, L-kanavanin, N-iminoetil-L-ornitin ill. -lizin (NIO, NIL), továbbá az L-ornitin és L-lizin, amelyekről ismert, hogy ugyanezt a CAT-2 transzportert használják ( $IC_{50} = 0.5-2$  mM). Közepes gátlást mutattak az arginin, illetve lizin szénlánc hosszának megfelelő méretű neutrális aminosavak, pl. norvalin, norleucin, leucin, valin, izoleucin, metionin, glutamin, illetve a bázikus tulajdonságú hisztidin ( $IC_{50} = 2.5-8$  mM). Fontos az  $\alpha$ -szénatomon levő csoportok szterikus helyzete, bár a bázikus aminosavak esetén nagyon gyenge ( $IC_{50} =$  kb. 10 mM) gátló hatást még D-izomerekkel is kaptunk. Ez arra utal, hogy az optimális szénlánc hossz és az annak végén elhelyezkedő bázikus vagy N-tartalmú csoport gyenge kötést még kedvezőtlen szterikus pozíció esetén is létrehozhat. A vizsgált vegyületek döntő

többsége egyáltalán nem hatott ( $IC_{50} \gg 10$  mM), köztük olyan arginin-analógok sem, ahol csak az  $\alpha$ -szénatom ligandjai tértek el az arginintől (pl. L-argininsav, agmatin). A kapott kísérleti adatokat csoportosítottuk és kvantitatív szerkezet-aktivitás összefüggésre (QSAR) irányuló számítógépes analízist végeztünk (Erős Dániel munkája, Vichem). Az analízis alapján a következő leírókat találtuk fontosnak a transzporterhez kötődés szempontjából: általános szerkezeti hasonlóság, hidrofobicitás, van der Waals térfogat, oldallánc pK-értéke, szénlánc hossz, L- és D-konfiguráció, az  $\alpha$ -aminocsoport szubsztituátlan jellege, bázikus vagy neutrális karakter, karboxilcsoport jelenléte. Az analízishez a neural network modell bizonyult a legalkalmasabbnak. Az eredmények értékelése frissen zárult le és a közlemény a zárójelentéssel egy időben kerül benyújtásra.

11. A különböző módon stimulált makrofágok citokin-termelésének összehasonlító vizsgálata a sejt kultúrák felülúszóiban.

Nyolc különböző citokin termelődését hasonlítottuk össze azoknak a kezeléseknél az alkalmazásával, amelyekkel az arginin-anyagcsere alternatív útjait próbáltuk befolyásolni egerekben és patkányokban. A mérések közvetlenül az adherenciával történő izolálás után (0 perc), illetve 3 órás és 24 órás tenyésztés után a sejtek felülúszóiból történtek. Az IL-1 $\beta$  egerek makrofágjaiban 3 óra után jelentősen változott a kazeinnel, karragenáttal és NDV-vel kezelt állatok makrofágjaiban (maximális érték 3800 pg/10<sup>6</sup> sejt, karragenát esetén, 3 óra után mérve), patkány makrofágokban alacsony szinten maradt. Az IL-6 hasonló tendenciát mutatott, de ott a 24 órás makrofág kultúrákban is magas maradt az IL-6 szint (maximális érték 1355 pg/10<sup>6</sup> sejt, kazein esetén, 24 óra után mérve). Az IL-10 koncentrációk általában alacsonyak voltak és nem változtak lényegesen, egerekben magasabb volt a citokin szintje (maximális érték 72 pg/10<sup>6</sup> sejt, kazein kezelésnél, 3 óra után mérve). Az IL-12 szintek mindkét állatban jól mérhetőek voltak, a kezelések kisebb mértékben, de inkább csökkentették a szintet (maximális érték egérben 402 pg/10<sup>6</sup> sejt, rezidens sejt, 24 óra után mérve, patkányban 870 pg/10<sup>6</sup> sejt, tioglikolátos állat makrofágjaiból 3 óra után mérve). Az interferon- $\gamma$  szintje egér makrofágokban karragenát (maximális érték 1457 pg/10<sup>6</sup> sejt, 0 óra után mérve), patkány sejtekben kazein (max. 9556 pg/10<sup>6</sup> sejt, 0 óra után mérve) és tioglikolát hatására emelkedett jelentősen és az izolálást követően időben csökkent. A TNF- $\alpha$  koncentrációját egér sejtekben kazein,

karragenát ( $22.69 \text{ ng}/10^6$  sejt, 0 órás minta) és NDV jelentősen növelte, főleg a frissen izolált sejtek felülúszóiban, patkány esetében az eleve magas értéket mutató rezidens makrofágokhoz képest (patkányban  $9.18 \text{ ng}/10^6$  sejt, 0 percnél mérve). A GM-CSF szintje mindenütt alacsony volt, nem változott ( $1-19 \text{ pg}/10^6$  sejt). A MIP-2 (makrofág gyulladásos fehérje) termelődése egérben a rezidenshez képest kissé csökkent és a 3 órás mintákban volt a legmagasabb ( $811 \text{ pg}/10^6$  sejt), patkány makrofágban viszont a karragenát kivételével valamennyi stimuláció emelte a MIP-2 szintjét, ugyancsak 3 óránál mérhető maximummal ( $2.25 \text{ ng}/10^6$  sejt). Megmértük a makrofágok fagocitáló képességét is és azt tapasztaltuk, hogy a BCG kivételével valamennyi kezelés után szignifikánsan emelkedett a fagocitózis, az egy makrofágra jutó bekebelezett baktériumok száma pedig patkány makrofágokban magasabb volt, mint egerekben (maximális értékek mindkét fajban NDV-vel; egér 5.53, patkány 6.81-es fagocitotikus index, internalizált baktérium/óra/ $10^6$  makrofág). A NOS illetve argináz expresszióval összehasonlítva az eredményeket, a két reakcióút intenzitása és az egyes citokinek termelése között csak néhány esetben lehetett gyengébb korrelációt találni. Ezeknél az  $R^2$ -értékek a következők voltak: NOS- $\text{IFN}\gamma$  patkány = 0.72; argináz-IL-10 egér: 0.76; NOS-IL-6 egér = 0.79; NOS-MIP-2 patkány = 0.82; NOS- $\text{TNF}\alpha$  patkány = 0.84; NOS-IL12 egér = - 0.65; argináz-MIP-2 egér = - 0.8; fagocitózis-IL1 $\beta$  egér = 0.7). A negatív értékek reciprok korrelációt jeleznek ! Kisebb  $R^2$  értékeket a korreláció teljes hiányának tekintettünk. Az eredményekből összeállított közlemény 2007 februárban került benyújtásra, az Inflammation Research c. laphoz, az ott megjelent cikk (ref. 4.) folytatásaként.

## 12. Az NF- $\kappa$ B jelátviteli utat gátló anyagok fagocitózist gátló hatása.

Az RTK-gátló vegyületek NOS II-expressziót és fagocitózist egyaránt gátló hatása adta azt az ötletet, hogy a NOS II indukciójáért felelős jelátviteli utat az NF- $\kappa$ B blokkolásával gátló ditiokarbamátok (pirrolidin-ditiokarbamát, PDTC; nátrium-ditiokarbamát, NDTC) fagocitózisra gyakorolt hatását is megvizsgáljuk. Mindkét vegyület erősen gátolta a makrofágok komplement-függő fagocitózist és apoptotikus folyamatokat is elindított a makrofágokban. Ugyanekkor az NF- $\kappa$ B jelátviteli út és a gátlás közötti kapcsolat nem volt világosan bizonyítható, mert pl. az ugyanilyen sajátosságáról ismert N-acetil-L-cisztein nem mutatott gátló hatást. Ennek alapján az



valószínűsíthető, hogy a PDTC és NDTC az NF- $\kappa$ B-től függetlenül korai apoptózist indít el a sejtekben, ami a fagocitáló képesség csökkenéséhez vezet. A mitokondriális membránpotenciál károsodását, mint az apoptózis jelét, itt is ki lehetett mutatni. A mechanizmus további tisztázása céljából a proteinkináz C illetve a foszfatidil-inozitol-3-kináz gátlószereivel (bis-indolil-maleimid illetve LY 294002) is vizsgáltuk a fagocitózist, de ezeket a kísérleteket még nem sikerült egyértelmű eredménnyel befejeznünk. A kísérletek lezárulásával ezeket az eredményeket is közölni szeretnénk.

Az eredeti programon kívüli vizsgálat eredménye:

NOS I aktivitásméréseket végeztünk a hipotalamusz véráramlás NOS-blokádhoz való alkalmazkodását vizsgáló kísérletekben. A kísérletek eredménye szerint a krónikus NO-hiányhoz való alkalmazkodás mechanizmusa független az értágító prosztanoidok képződésétől. Ennek eredménye egy közös közlemény, amely 2007-ben jelent meg: Hortobágyi L., Kis B., Hrabák A., Horváth B., Huszty G., Schweer H., Benyó B., Sándor P., Busija D.W., Benyó Z.: Adaptation of the hypothalamic blood flow to chronic nitric oxide deficiency is independent on vasodilator prostanoids. Brain Res. 1131, 129-137 (2007); IF: 2.37 (mivel nem tartozik az eredeti témához, nem szerepel a közlemények jegyzékében). Egy előadás is készült az anyagból (Ref.1).

*Az eredeti szerződésben vállaltakhoz képest az alábbi eltérések történtek:*

1. Az eredeti tervezetben más vírusok kipróbálása is szerepelt. Mivel kiderült, hogy ezeket nem lehetett megfelelő minőségben beszerezni, helyette a sejtvonalak NO-érzékenységének összehasonlító vizsgálatát, valamint a makrofágok arginin-felvételében szerepet játszó szerkezeti sajátosságok vizsgálatát tűztük ki célul. Az arginin-transzport ugyanis nélkülözhetetlen a NOS megfelelő szubsztrát-ellátásához.
2. Mivel a rendszeres NOS mérések be vannak állítva a laboratóriumban, az előző pontban említett kooperációban NOS-mérésekkel közreműködtünk a hipotalamikus véráramlás NOS-blokádhoz való adaptációjának vizsgálatában.

*A kutatási téma további lehetséges irányai, az eredmények felhasználásának, hasznosításának lehetőségei*

1. A Newcastle Disease Virus hatásával kapcsolatban végzett kísérleteink eredményei arra utalnak, hogy a vírus hatására bekövetkező antitumor hatás legalábbis részben az NO-termelés fokozásával is magyarázható, amennyiben NO-érzékenyek a daganatos sejtek. Bár az általunk vizsgált sejtvonalak mindegyike NO-érzékeny volt, bár ennek mértéke különbözött. Az a tény, hogy a peritoneális kezelés eredményessége jóval meghaladta az intravénásét, arra utal, hogy a NOS indukciójához célszerű az NDV-vakcinát közvetlenül a tumoros szövetbe juttatni, bár az sem zárható ki, hogy más szervekben található makrofágok a véren keresztül érkező vírus-provokációra a hasüregi sejteknél jobban válaszolnak. A módszer továbbfejlesztésével Csatáry dr. foglalkozik, tudomásunk szerint a kezelés hivatalos elfogadtatásának egyik fő akadálya a vakcina állandó egyenletes minőségének biztosítása; ezzel kapcsolatosan magunk is tapasztaltunk problémákat. Magát a kezelést ígéretesnek tartjuk, több esetben kaptunk külföldről kéréseket e-mailben a vakcinához való hozzájutásra sikertelen kezelésekből részesülőkől, akik a megjelent közlemény alapján fordultak hozzánk. Őket Csatáry dr.-hoz irányítottuk. Továbblépést megfelelő minőségű vakcina állandó biztosítása esetén látnánk lehetségesnek.
2. A receptor-tirozinkináz kísérletek tanulsága, hogy a kedvező mellékhatás-profil miatt kedvelt RTK-inhibitorok egy részének is lehetnek az immunrendszeri sejtek funkcióit károsító hatásai. A makrofágok, mint modellsejtek fagocitotikus kapacitását egyes RTK-inhibitorok erősen, mások gyengébben, némelyek pedig egyáltalán nem csökkentik. Mivel a fagocitózis a makrofágok alapvető immunológiai funkciója, alkalmas lehet az RTK-inhibitorok mellékhatásának tesztelésére. Egy erre vonatkozó alapos, sok vegyületre kiterjedő QSAR-vizsgálatot a 2007-2010 közötti időszakra beadott OTKA-pályázatban terveztünk.
3. A sejtvonalakon végzett in vitro NO-érzékenységi tesztek után daganatok in vivo NO-érzékenységének tesztelését is szeretnénk elvégezni. Ez ugyancsak a 2007-2010-es periódusra benyújtott OTKA-pályázatunk egyik témája lenne.

Budapest, 2007. február 22.

dr. Hrabák András  
egyetemi docens, témavezető